

## γ-γ-Dimethyl-allyl-pyrophosphat und Geranyl-pyrophosphat, biologische Vorstufen des Squalens

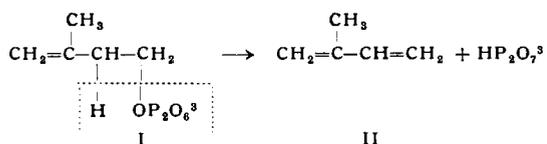
### Zur Biosynthese der Terpene, VI<sup>1)</sup>

Von Prof. Dr. F. LYNEN, Dr. B. W. AGRANOFF, Dr. H. EGGERER,  
Dr. U. HENNING und E. M. MÖSLEIN

Max-Planck-Institut für Zellchemie, München, und Chemisches Laboratorium der  
Universität München, Institut für Biochemie

3-Methyl-Δ<sup>3</sup>-butenyl-1-pyrophosphat (Isopentenyl-pyrophosphat) spielt im Stoffwechsel die Rolle eines „aktiven Isoprens“, d. h. es ist der gemeinsame Baustein aller unter die „Isoprenregel“ fallenden Naturstoffe. Es wird über die 6-fache Anreicherung einer Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase aus Hefe berichtet, die Isopentenyl-pyrophosphat in Dimethyl-allyl-pyrophosphat umwandelt, das dann als Starter für den Aufbau von Terpen-Kohlenstoffketten aus C<sub>5</sub>-Einheiten dient. Die Verknüpfung der C<sub>5</sub>-Einheiten besorgt das Enzym Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase, das aus Hefe 20-fach angereichert werden konnte. Setzt man in die Synthetase-Reaktion Isopentenyl-pyrophosphat neben einem großen Überschuß von Dimethyl-allyl-pyrophosphat ein, so läßt sich als erstes Kondensationsprodukt Geranyl-pyrophosphat nachweisen, das durch Anfügen einer weiteren C<sub>5</sub>-Einheit in Farnesyl-pyrophosphat übergeht. Damit sind jetzt alle Syntheseschritte geklärt, die auf dem Wege vom Acetyl-CoA zum Squalen liegen, das seinerseits wieder Vorstufe der cyclischen Triterpene und Sterine ist.

Wir haben kürzlich über Versuche berichtet, die zur Identifizierung von 3-Methyl-Δ<sup>3</sup>-butenyl-1-pyrophosphat (= Isopentenyl-pyrophosphat) und Farnesyl-pyrophosphat als biologischen Vorstufen des Squalens führten<sup>2)</sup>. Von diesen erwies sich Isopentenyl-pyrophosphat, das auch im Blochschen Arbeitskreis<sup>3)</sup> aufgefunden wurde, als das „aktive Isopren“, jener seit langem vermutete gemeinsame Baustein aller unter die „Isoprenregel“ von Ruzicka<sup>4)</sup> fallenden Naturstoffe. Wie ein Blick auf die Strukturformel des Δ<sup>3</sup>-Isopentenyl-pyrophosphats (I) erkennen läßt, liegt in dieser Verbindung tatsächlich ein maskiertes Isopren vor: durch Abspaltung von Pyrophosphat würde sie in Isopren (II) übergehen.



Daß diese intermediäre Bildung freien Isoprens jedoch beim biologischen Aufbau der Terpene aus Isopentenyl-pyrophosphat nicht beteiligt ist (vgl. dagegen<sup>5)</sup>), bewies die Entdeckung von Farnesyl-pyrophosphat als Vorläufer

des Squalens<sup>2)</sup>. Außerdem konnte in den Laboratorien Blochs<sup>6)</sup> und Popjaks<sup>7)</sup> durch Versuche mit Isopren der ungesättigte Kohlenwasserstoff als Zwischenprodukt der Terpensynthese ausgeschlossen werden.

Genaueren Einblick in die Biosynthese der Kohlenstoffketten der Terpene aus den C<sub>5</sub>-Einheiten ermöglichten Versuche mit 1-<sup>14</sup>C-Isopentenyl-pyrophosphat, das nach



Abb. 1  
Silbersalz des „aktiven Isoprens“ (Ag<sub>2</sub>-Isopentenyl-pyrophosphat).  
(300-fache Vergr.)

dem in unserem Laboratorium entwickelten Verfahren<sup>2)</sup> aus <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> dargestellt und als in farblosen Nadeln kristallisierendes Silbersalz (Abb. 1) nunmehr in reiner Form gewonnen werden konnte<sup>8)</sup>.

<sup>1)</sup> V. Mitteilung: U. Henning, E. M. Möslin u. F. Lynen, Arch. Biochem. Biophysics 83, 259 [1959].

<sup>2)</sup> F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning u. I. Kessel, diese Ztschr. 70, 738 [1958].

<sup>3)</sup> S. Chaykin, J. Law, A. H. Phillips, T. T. Tchen u. K. Bloch, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44, 998 [1958].

<sup>4)</sup> L. Ruzicka, Experientia 9, 357 [1953].

<sup>5)</sup> H. Rilling, T. T. Tchen u. K. Bloch, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44, 167 [1958].

<sup>6)</sup> Vgl. 3), Fußnote 4.

<sup>7)</sup> J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, G. Popják u. I. Y. Gore, Biochem. J. 69, 146 [1958].

<sup>8)</sup> H. Eggerer u. F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 630, im Druck.



amid (XI) ( $N,N'$ -Dicyclohexyl-guanidinium-salz, Fp 162–163 °C), das bei der Behandlung mit Phosphorsäure in Pyridin/o-Chlorphenol in Dimethyl-allyl-pyrophosphat (III) überging. Diese Verbindung konnte über das in Wasser schwerlösliche Bariumsalz isoliert werden.

Das synthetische Dimethyl-allyl-pyrophosphat ermöglichte uns auch den noch fehlenden Beweis, daß die Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase beim biologischen Aufbau der Kohlenstoffketten der Terpene beteiligt ist. Dies war vom chemischen Standpunkt aus naheliegend, weil erst im Allyl-pyrophosphat das Carbonium-Ion vorgebildet ist, dessen Umsetzung mit der reaktiven Doppelbindung des Isopentenyl-pyrophosphates zur C–C-Verknüpfung führt (vgl. S. 661). Außerdem hatten wir ja beobachtet<sup>2)</sup>, daß die Terpen-Synthese aus (+)-Mevalonsäure-5-phosphat im Hefeextrakt auf der Stufe des Isopentenyl-pyrophosphates stecken bleibt, wenn man den Ansatz mit Jodacetamid vergiftet; ein Befund, der uns bei der Isolierung des Isopentenyl-pyrophosphates wertvolle Dienste leistete<sup>2)</sup>.

Daß die Unterbindung der Terpen-Synthese im Hefeextrakt durch Jodacetamid einzig und allein auf der Hemmung der Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase beruht, ließ sich nun durch Versuche mit Dimethyl-allyl-pyrophosphat beweisen. Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, gewinnt der mit m/200 Jodacetamid vergiftete Hefeextrakt die

Dimethyl-allyl-PP zuges.	<sup>14</sup> C im Squalen [Imp./min]
—	21
0,1 μM	1100

Die Ansätze enthielten 20 μM Trispuffer, p<sub>H</sub> 8,0, 6 μM MgCl<sub>2</sub>, 6 μM MgK<sub>2</sub>-äthylendiamin-tetraacetat, 3 μM Jodacetamid, 1 μM K<sub>2</sub>-Glucose-6-phosphat, 0,2 μM TPN, 0,061 μM K<sub>2</sub>-<sup>14</sup>C-Isopentenyl-pyrophosphat (2200 Imp./min) und 0,3 mg Protein des Hefeextrakts (Bereitung vgl.<sup>2)</sup> Tabelle 1). Ges.-Vol. = 0,6 ml. Sie wurden 15 min bei 37 °C inkubiert. Das gebildete Squalen wurde dem mit methanolischem KOH versetzten Reaktionsgemisch durch Petroläther entzogen und durch Chromatographie an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gereinigt.

Tabelle 1. Abhängigkeit der Squalen-Bildung aus <sup>14</sup>C-Isopentenyl-pyrophosphat vom Dimethyl-allyl-pyrophosphat

Fähigkeit zur Squalen-Bildung aus <sup>14</sup>C-Isopentenyl-pyrophosphat zurück, wenn man dem üblichen Ansatz mit Mg<sup>2+</sup> und reduziertem Triphospho-pyridin-nucleotid (TPNH)<sup>2)</sup> Dimethyl-allyl-pyrophosphat, d. h. das Produkt der gehemmten Reaktion, zusetzt.

### Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase und Geranyl-pyrophosphat

In Abwesenheit von TPNH und der Partikeln des Hefeextrakts, die nur für die reduktive Dimerisierung der Sesquiterpen-Einheit nötig sind<sup>2)</sup>, bleibt die Reaktion auf der Stufe von Farnesyl-pyrophosphat stehen.

Zum Nachweis dieser Verbindung nützten wir ihre durch die Allyl-Gruppierung bedingte Säurelabilität aus: Wir bestimmten die Radioaktivität, die sich nach Ansäuern der bebrüteten Reaktionsansätze mit Petroläther extrahieren ließ, und die, wie die papierchromatographische Analyse ergab, durch C<sub>15</sub>-Terpenalkohole vom Typus des Farnesols oder Nerolidols (Allyl-Umlagerung bei der sauren Hydrolyse!) bedingt war.

Mit dieser einfachen Methode läßt sich auch das für die Bildung von Farnesyl-pyrophosphat aus C<sub>5</sub>-Einheiten verantwortliche Enzym, für welches wir den Namen Farnesylpyrophosphat-Synthetase vorschlagen, quantitativ bestimmen. Wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, steigt die Radioaktivität in der Petroläther-Phase proportional der zugesetzten Enzymmenge an. Die Synthetase des Hefeextrakts konnte nach Abtrennung unwirksamer Eiweißstoffe durch

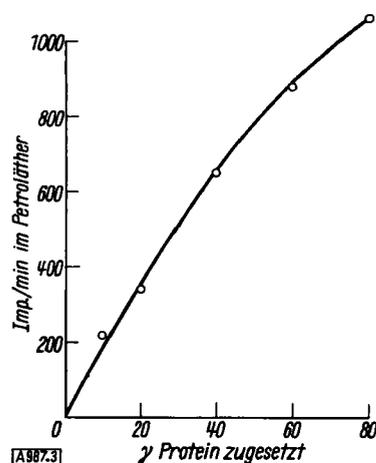


Abb. 3. Bestimmung der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase  
Ansätze: 20 μM Trispuffer (p<sub>H</sub> 8,0), 6 μM MgCl<sub>2</sub>, 6 μM MgK<sub>2</sub>-äthylendiamin-tetraacetat, 3 μM Jodacetamid, 1 mg Serumalbumin, 0,05 μM K<sub>2</sub>-<sup>14</sup>C-Isopentenyl-pyrophosphat (1825 Imp./min), 0,08 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Dimethyl-allyl-pyrophosphat und Toluol-Autolysat aus Bäckerhefe (vgl. Abszisse). Ges.-Vol. = 0,6 ml. 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 μM Farnesol als Träger mit 0,1 ml 3 m Trichloressigsäure versetzt, nach kurzem Stehen mit 0,2 ml 10 n KOH alkalisch gemacht und nacheinander mit 3 bzw. 2 ml Petroläther (30–50 °C) ausgeschüttelt. Radioaktivität des mit 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschenen Petroläther-Extraktes im Szintillationszähler (Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 314) gemessen

Adsorption an Al(OH)<sub>3</sub>, durch Konzentrierung mittels Ammonsulfat-Fällung und Chromatographie an DEAE-Cellulose etwa 20-fach angereichert werden (Tabelle 2).

	Protein [mg]	Enzym-Einheiten*)	Spez. Enzym-Aktiv.	Ausbeute [%]
Autolysat aus 100 g Hefe	1200	329	0,27	—
Filtrat der Adsorption an Al(OH) <sub>3</sub> -Gel .....	310	280	0,9	85
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung (0–85) .....	300	252	0,8	77
Chromatographie an DEAE-Cellulose**) ...	19	75,5	4	23

\*) 1 Enzym-Einheit ist diejenige Synthetase-Menge, die im Enzym-Test (vgl. Abb. 3) 1 μM Isopentenyl-pyrophosphat umsetzt.

\*\*) Entwicklung mit 0,05 m NaCl/0,005 m K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> bis 0,1 m NaCl/0,005 m K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

Tabelle 2. Reinigung der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase aus Hefezellen

Unter Verwendung dieses Enzyms ließen sich zwei Fragen beantworten. Erstens die nach dem Schicksal der Pyrophosphat-Reste, die beim Aufbau von Farnesyl-pyrophosphat aus einem Molekül Dimethyl-allyl-pyrophosphat und zwei Molekülen Isopentenyl-pyrophosphat freigesetzt werden. In früheren Versuchen hatten wir den

Versuchsreihe:	Änderungen im Ansatz	μM Isopentenyl-PP eingebaut*)	μM Orthophosphat gebildet**)
A	—	0,078	0,144
	+ 30 μM K-fluorid ohne Isopentenyl-PP	0,076	0
	ohne Dimethyl-allyl-PP	0	0
B	—	0,06	0,133
	+ 30 μM K-fluorid ohne Isopentenyl-PP	0,044	0
	—	—	0

\*) Aus der Radioaktivität des Petroläther-Extrakts (vgl. Abb. 3) berechnet.

\*\*) Bestimmung nach Fiske-Subbarow.

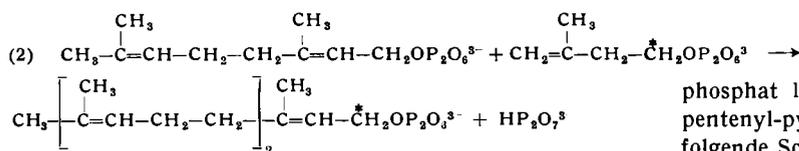
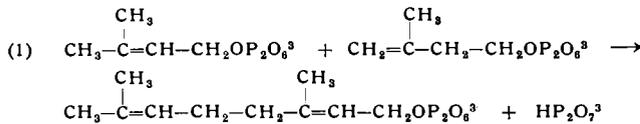
Versuchsansatz: Vgl. Abb. 3, jedoch mit (A) 0,35 μM bzw. (B) 0,1 μM K<sub>2</sub>-<sup>14</sup>C-Isopentenyl-pyrophosphat, (A) 0,35 μM bzw. (B) 0,1 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Dimethyl-allyl-pyrophosphat und 45 γ Synthetase (spez. Akt. = 3,2). 30 min bei 37 °C inkubiert

Tabelle 3. Phosphat-Bilanz der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase aus Isopentenyl-pyrophosphat und Dimethyl-allyl-pyrophosphat



Fp 130 bis 131 °C) phosphoryliert und durch Behandlung mit Natrium-amalgam in Geranyl-phosphat (XIV) umgewandelt. Nach Überführung in das entsprechende Amid (XV) lieferte die Umsetzung mit Phosphorsäure in Pyridin schließlich Geranyl-pyrophosphat (XVI), das in Form des aus Wasser-Aceton in Blätchen kristallisierenden Ammoniumsalzes rein gewonnen werden konnte.

Die Schwierigkeit bei der chemischen Synthese der Allyl-phosphate beruht auf ihrer Säureempfindlichkeit. Wir haben die Verseifung-Geschwindigkeit in n/10 HCl bei 25 °C gemessen und als Halbwertszeiten für Dimethyl-allyl-phosphat 6,7 min, für Geranyl-phosphat 10,2 min, für Geranyl-pyrophosphat jedoch nur 1,7 min gefunden. Die größere Solvolyse-Geschwindigkeit des Pyrophosphates dürfte sich daraus erklären lassen, daß Pyrophosphorsäure eine stärkere Säure ist als Phosphorsäure und deshalb leichter eliminiert wird, eine Tatsache, die wahrscheinlich auch bei der von der Synthetase katalysierten Kondensation Bedeutung hat.



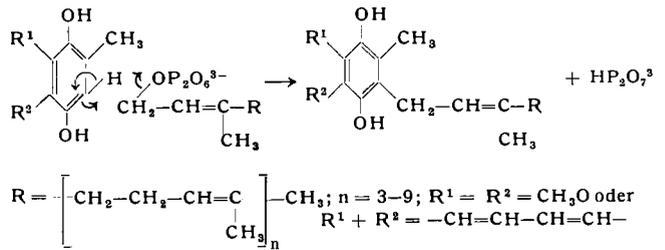
Die bisherigen enzymatischen Versuche deuten darauf hin, daß die Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase der Hefe keinen sehr engen Spezifitätsbereich besitzt und sowohl die Umsetzung von Dimethyl-allyl-pyrophosphat mit Isopentenyl-pyrophosphat zu Geranyl-pyrophosphat (Gleichung 1), als auch die Weiterreaktion des Geranyl-pyrophosphates zu Farnesyl-pyrophosphat (Gleichung 2) katalysiert.

Für das Enzym ist Geranyl-pyrophosphat als Folge einer dreifach höheren Wechselzahl das bevorzugte Substrat. Dagegen liegt die Affinität der Synthetase zu Dimethyl-allyl-pyrophosphat und Geranyl-pyrophosphat in der gleichen Größenordnung; die zu Isopentenyl-pyrophosphat erwies sich als dreimal größer, wie aus den *Michaelis*-Konstanten:  $1 \cdot 10^{-4}$  (Mol Dimethyl-allyl-pyrophosphat/l),  $0,9 \cdot 10^{-4}$  (Mol Geranyl-pyrophosphat/l) und  $3,3 \cdot 10^{-5}$  (Mol Isopentenyl-pyrophosphat/l) hervorgeht. Die höhere Wechselzahl des Enzyms mit Geranyl-pyrophosphat dürfte dafür verantwortlich sein, daß wir dieses Zwischenprodukt der Terpensynthese erst fassen konnten, als durch Zusatz eines großen Überschusses von Dimethyl-allyl-pyrophosphat der erste Reaktionsschritt stark begünstigt wurde.

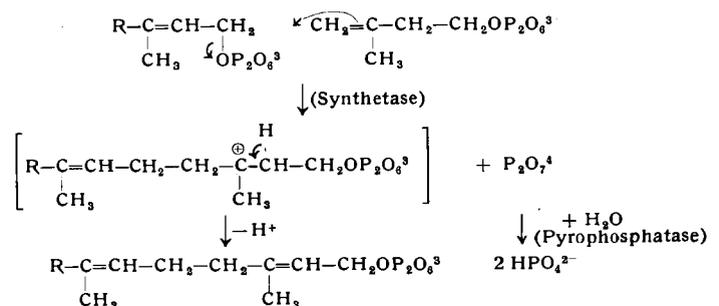
Ob unsere gereinigte Synthetase noch weitere Schritte, wie die Umsetzung des Farnesyl-pyrophosphats mit Isopentenyl-pyrophosphat zu Geranyl-geranyl-pyrophosphat usw.<sup>2)</sup> katalysiert, haben wir bisher nicht untersucht. Bei Experimenten mit rohen Protein-Fractionen aus Hefe konnten wir die Bildung eines säurelabilen Derivates des Geranyl-geraniols papierchromatographisch wahrscheinlich machen<sup>20)</sup>. Allerdings handelte es sich dabei um eine im Vergleich zur Farnesyl-pyrophosphat-Bildung langsame Reaktion.

Daß in Hefezellen wie auch im tierischen Organismus der Aufbau von Polyterpen-Ketten nicht auf der Stufe des Farnesyl-pyrophosphates haltmacht, geht aus der Existenz der verschiedenen Vitamine K<sub>2</sub> und Ubichinone bzw. Coenzyme Q hervor, in denen man isoprenoide Seitenketten mit bis zu 50 C-Atomen nachgewiesen hat<sup>21-24)</sup>. Man darf wohl annehmen, daß diese aromati-

sehen Chinone bzw. Hydrochinone in der Zelle durch enzymatische Alkylierung von Methyl-naphtho-hydrochinon oder 2,3-Dimethoxy-5-methyl-hydrochinon mit Polyterpenyl-pyrophosphat entstanden sind<sup>25)</sup>, was sich schematisch folgendermaßen beschreiben läßt:



Auch die von unserer Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase katalysierte C-C-Verknüpfung ist eine C-Alkylierung, wobei das aus dem Allyl-Derivat gebildete Carboanion mit der reaktionsfähigen Doppelbindung des Isopentenyl-pyrophosphates reagiert und unter Abgabe eines Protons das homologe, um eine C<sub>5</sub>-Einheit verlängerte Allyl-pyrophosphat liefert. Dieses kann nun von neuem mit Isopentenyl-pyrophosphat umgesetzt werden usw., wie es das folgende Schema beschreibt:



Die wichtige Rolle der von uns entdeckten Isomerase für die Terpen-Synthese wird damit klar ersichtlich. Sie stellt durch Isomerisierung des Isopentenyl-pyrophosphates, des eigentlichen „aktiven Isoprens“, das Allyl-Derivat zur Verfügung, mit dem der Aufbau der Terpen-Kohlenstoffketten aus C<sub>5</sub>-Einheiten erst gestartet werden kann. Ist aber dieser Prozeß einmal in Gang gekommen, so läuft er ohne neuerliche Isomerisierung weiter, im Falle der Squalen-Synthese bis zur Stufe des Farnesyl-pyrophosphates, im Falle der Synthese der Carotinoide, der Vitamine K<sub>2</sub> oder der verschiedenen Coenzyme Q bzw. Ubichinone über diese Stufe hinaus<sup>2)</sup>.

### Der Weg der Squalen-Synthese

Bei Experimenten an Hefe haben *Sonderhoff* und *Thomas*<sup>26)</sup> 1937 im Münchner Laboratorium entdeckt, daß Essigsäure bei der Biosynthese der Sterine Verwendung findet. In schönen Experimentalarbeiten hat dann *Bloch*<sup>27, 28)</sup> den Nachweis geführt, daß alle 27 Kohlenstoffatome des Cholesterins aus Essigsäure stammen, und überdies, ergänzt durch Untersuchungen von *Cornforth* und *Popják*<sup>29)</sup>, auch die Verteilung des Methyl- und Carboxyl-Kohlenstoffs der Essigsäure im Cholesterin festlegen können. *Bloch* wies außerdem nach, daß neben Essigsäure auch Leucin bzw. Isovaleriansäure zu den biologischen Vorstufen des Cholesterins zählen<sup>30)</sup> und daß die Biosynthese des Sterins über den Terpenkohlenwasserstoff Squalen führt<sup>29, 31)</sup>, wie dies *Channon*<sup>32)</sup> aus Fütterungsversuchen mit Ratten bereits 1926 erschlossen hatte.

<sup>26)</sup> F. Lynen, J. cellular comparat. Physiol., im Druck.

<sup>27)</sup> R. Sonderhoff u. H. Thomas, Liebigs Ann. Chem. 530, 195 [1937].

<sup>28)</sup> K. Bloch, Harvey Lectures 48, 68 [1954].

<sup>29)</sup> R. B. Woodward u. K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. 75, 2023 [1953].

<sup>30)</sup> Übersicht vgl. G. Popják, Annu. Rev. Biochem. 27, 533 [1958].

<sup>31)</sup> K. Bloch, J. biol. Chemistry 155, 255 [1944]; I. Zabin u. K. Bloch, ebenda 185, 131 [1950].

<sup>32)</sup> R. G. Langdon u. K. Bloch, ebenda 200, 129, 135 [1953].

<sup>33)</sup> H. J. Channon, Biochem. J. 20, 400 [1926].

<sup>20)</sup> U. Henning, unveröffentl.

<sup>21)</sup> O. Isler, diese Ztschr. 71, 7 [1959].

<sup>22)</sup> D. E. Wolf, C. H. Hoffman, N. R. Trenner, B. H. Arison, C. H. Shunk, B. O. Linn, J. F. McPherson u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 80, 4752 [1958].

<sup>23)</sup> R. A. Morton, U. Gloor, O. Schindler, G. M. Wilson, L. H. Chopard-Dit-Jean, F. W. Hemming, O. Isler, W. M. F. Leat, I. F. Pennock, R. Rüegg, U. Schwieter u. O. Wiss, Helv. chim. Acta 41, 2343 [1958].

<sup>24)</sup> U. Gloor, O. Isler, R. A. Morton, R. Rüegg u. O. Wiss, ebenda 41, 2357 [1958].

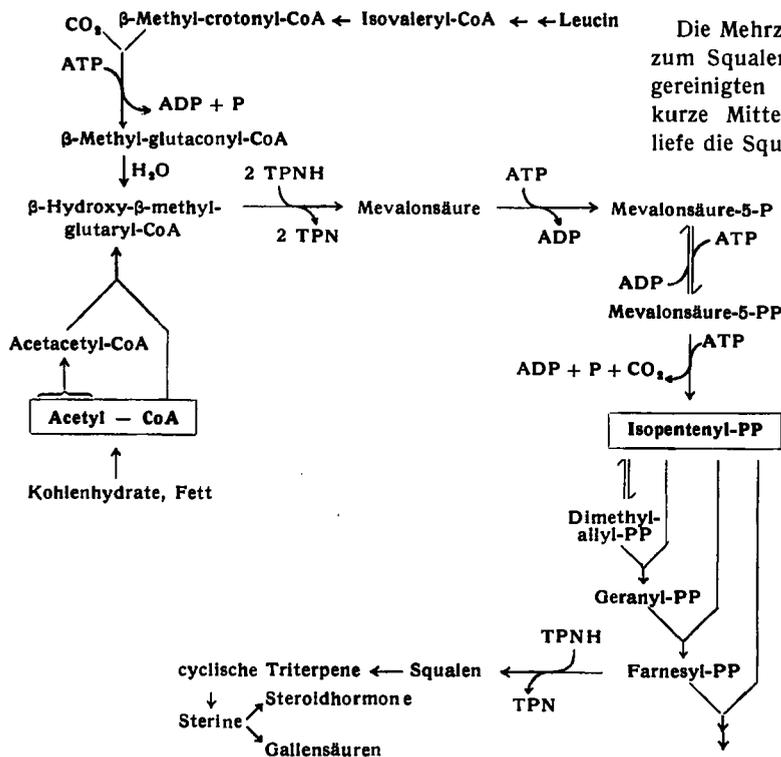


Abb. 5. Der Weg der biologischen Squalen-Synthese

Die intensive Forschung auf diesem Gebiet in den letzten Jahren, die mit der Entdeckung der Mevalonsäure im Folkersschen Arbeitskreis<sup>33</sup> ausgelöst und in den Laboratorien von Bloch<sup>3, 16, 34, 35</sup>, Coon<sup>36</sup>, Folkers<sup>37</sup>, Gurin<sup>38</sup>, Popják<sup>39, 40</sup>, Rudney<sup>40, 41</sup>, Tavormina<sup>42</sup>, und von uns<sup>1, 2, 10, 43-47</sup> geleistet wurde, klärte alle Zwischenprodukte auf, die am Weg von der Essigsäure über Acetyl-CoA zum Squalen liegen. Sie sind im Schema der Abb. 5 zusammengestellt. Ein wichtiger Knotenpunkt dieser Biosynthesekette liegt im  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl-glutaryl-CoA, wo der Weg vom Leucin über Isovaleryl-CoA zu den Sterinen mit demjenigen vom Acetyl-CoA zusammen trifft.

- <sup>33</sup>) L. D. Wright, E. L. Cresson, H. R. Skeggs, G. D. E. MacRae, C. H. Hoffman, D. E. Wolf u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 78, 5273 [1956]; D. E. Wolf, C. H. Hoffman, P. E. Aldrich, H. R. Skeggs, L. D. Wright u. K. Folkers, ebenda 78, 4499 [1956]; 79, 1486 [1957].
- <sup>34</sup>) K. Bloch: Ciba Foundation Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols, J. & A. Churchill, Ltd., London 1959, S. 4.
- <sup>35</sup>) A. DeWaard, A. H. Phillips u. K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. 81, 2913 [1959].
- <sup>36</sup>) M. J. Coon, F. P. Kupiecki, E. E. Dekker, M. J. Schlesinger u. A. Del Campillo: Ciba Foundation Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols, J. & A. Churchill, Ltd., London 1959, S. 62.
- <sup>37</sup>) K. Folkers, C. H. Shunk, B. O. Linn, F. M. Robinson, P. E. Wittreich, J. W. Huff, J. L. Gilfillan u. H. R. Skeggs, ebenda S. 20.
- <sup>38</sup>) F. Dituri, S. Gurin u. J. L. Rabinowitz, J. Amer. chem. Soc. 79, 2650 [1957]; F. Dituri, J. L. Rabinowitz, R. P. Hullin u. S. Gurin, J. biol. Chemistry 229, 825 [1957].
- <sup>39</sup>) G. Popják: Ciba Foundation Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols, J. & A. Churchill, Ltd., London 1959, S. 148.
- <sup>40</sup>) H. Rudney, ebenda S. 75.
- <sup>41</sup>) J. J. Ferguson jr., I. F. Durr u. H. Rudney, Proc. nat. Acad. Sci. USA. 45, 499 [1959].
- <sup>42</sup>) P. A. Tavormina, M. H. Gibbs u. J. W. Huff, J. Amer. chem. Soc. 78, 4498 [1956]; P. A. Tavormina u. M. H. Gibbs, J. Amer. chem. Soc. 78, 6210 [1956].
- <sup>43</sup>) F. Lynen: Proc. International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto 1957. Maruzen, Tokyo 1959, S. 57.
- <sup>44</sup>) F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning, J. Knappe, I. Kessel u. E. Ringelmann: Ciba Foundation Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols, J. & A. Churchill, Ltd., London 1959, S. 95.
- <sup>45</sup>) F. Lynen, J. Knappe, H. Eggerer, U. Henning u. B. W. Agranoff, Federation Proc. 78, 278 [1959].
- <sup>46</sup>) F. Lynen, U. Henning, C. Bublitz, B. Sörbo u. L. Kröplin-Rueff, Biochem. Z. 330, 269 [1958].
- <sup>47</sup>) F. Lynen, J. Knappe, E. Lorch, G. Jütting u. E. Ringelmann, diese Ztschr. 71, 481 [1959].

Die Mehrzahl der Reaktionen, die von der Mevalonsäure zum Squalen führen, wurden ausführlich bisher nur mit gereinigten Enzymen aus Hefezellen studiert. Einige kurze Mitteilungen<sup>39, 48-50</sup> erwecken den Anschein, als liefe die Squalen-Synthese in der Leber über andere, z. T. noch carboxylgruppen-haltige, Zwischenprodukte.

Unsere Versuche mit Rattenleber zeigten dagegen, daß in der Leber Squalen in gleicher Weise wie in der Hefe gebildet werden kann: einmal konnten wir mit Hilfe unserer spezifischen Enzymteste sämtliche Enzyme dieser Reaktionskette (Abb. 5) auch in Leberextrakten — teilweise sogar in höherer Aktivität als im Hefeextrakt — nachweisen<sup>51, 52</sup>). Zum anderen fanden wir bei Untersuchungen über die Squalen-Synthese aus  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat und Dimethylallyl-pyrophosphat, daß sich Enzymfraktionen aus Hefe und Leber gegeneinander austauschen lassen. Wie schon früher berichtet<sup>2</sup>), ist das die reduktive Dimerisierung von Farnesyl-pyrophosphat zu Squalen katalysierende Enzymesystem in Hefe wie in Leber fest an Zellpartikel gebunden. Die in Tabelle 5 wiedergegebenen

Enzym-System	Radioaktivität [Imp./min]	
	Squalen-Fraktion	Terpenalkohol-Fraktion
Leberüberstand*) (= 1 mg Protein)	5	560
Leberüberstand (= 1 mg Protein) + 0,1 ml Hefepartikel**)	980	—
Leberüberstand (= 2 mg Protein) + 0,1 ml Hefepartikel	1610	—
0,1 ml Hefepartikel	0	0
300 $\gamma$ Hefe-Synthetase	0	850
300 $\gamma$ Hefe-Synthetase + 0,02 ml Leberpartikel*)	370	—
300 $\gamma$ Hefe-Synthetase + 0,05 ml Leberpartikel	690	—
0,05 ml Leberpartikel	0	0

\*) Rattenleberhomogenat in 0,25 m Rohrzucker durch Zentrifugieren bei 2000 g von Kernen, intakten Zellen und größeren Zelltrümmern befreit und dann durch einstündiges Zentrifugieren bei 100000 g in den „Überstand“ und die Mitochondrien-Mikrosomen-Fraktion getrennt. 0,05 ml dieser suspendierten „Leberpartikel“, die zweimal mit 0,25 m Rohrzucker gewaschen waren, entsprechen 85 mg Leber.

\*\*\*) Gewaschene Hefepartikel werden nach<sup>2</sup>) Tabelle 1 gewonnen. 0,1 ml der suspendierten „Hefepartikel“ entsprechen 350 mg Hefe.

Ansatz: 20  $\mu\text{M}$  Trispuffer ( $\text{pH}$  8,0), 6  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ , 6  $\mu\text{M}$   $\text{MgK}_2$ -äthylen-diamin-tetraacetat, 3  $\mu\text{M}$  Jodacetamid, 2  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2$ -Glucose-6-phosphat, 0,2  $\mu\text{M}$  TPN, 0,38  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2$ - $^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat (2600 Imp./min), 0,4  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2$ -Dimethyl-allyl-pyrophosphat, 1 mg Serumalbumin und 20  $\gamma$  Zwischenferment. Ges.-Vol. = 0,6 ml. 30 min unter  $\text{N}_2$  bei 37 °C inkubiert. Isolierung des Squalens vgl. Tabelle 4. Um die gebildeten Terpenalkohole zu isolieren, wurde die nach Abtrennung des Squalens verbliebene alkalische Wasser-Methanol-Phase mit 0,5  $\mu\text{M}$  Farnesol als Träger versetzt, zur Spaltung der Allylpyrophosphate mit 0,5 ml 70-proz.  $\text{HClO}_4$  angesäuert, nach kurzem Stehen mit 1,5 ml 10n KOH wieder stark alkalisch gemacht und erneut nacheinander mit 3 ml und 2 ml Petroläther extrahiert. Die Radioaktivität der mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschenen Petroläther-Extrakte wurde im Szintillationszähler bestimmt.

Tabelle 5. Squalen-Synthese mit Mischungen aus Hefe- und Leber-Enzymen

- <sup>48</sup>) G. Popják, M. Horning, N. L. R. Bucher u. R. H. Cornforth, Biochem. J. 72, 104 [1959].
- <sup>49</sup>) J. W. Olgivie u. R. G. Langdon, J. Amer. chem. Soc. 81, 754 [1959].
- <sup>50</sup>) J. W. Olgivie, ebenda 81, 756 [1959].
- <sup>51</sup>) B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning u. F. Lynen, J. biol. Chemistry, im Druck.
- <sup>52</sup>) M. Tada, unveröffentl.

Versuche belegen nun, daß sowohl in der Kombination Leberpartikel + Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase aus Hefe als auch in der Kombination Hefepartikel + löslicher Anteil des Leberextraktes („Leberüberstand“) Squalen gebildet wird. In Abwesenheit der Partikel entstand in beiden Versuchsreihen keine Spur Squalen. An seiner Stelle konnten nach Behandlung der

Versuchsansätze mit Säure Terpenalkohole isoliert werden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für finanzielle Unterstützung, Herrn Dr. O. Isler (Hoffmann-La Roche AG., Basel) für die Überlassung von Geraniol und Farnesol.

Eingegangen am 17. August 1959 [A 987]

## Die Brennbarkeit von Metallen in Sauerstoff

### 1. Die Verbrennungsgeschwindigkeit von Eisen-Drähten in ruhendem Sauerstoff

Von Dr. L. KIRSCHFELD

Bundesanstalt für Materialprüfung, Berlin-Dahlem

Die Verbrennungs-Geschwindigkeit von zylindrischen Eisen-Drähten in Sauerstoff ist dem Draht-Querschnitt umgekehrt und der Wurzel des Sauerstoff-Drucks direkt proportional; die pro Zeiteinheit verbrannte Eisen-Menge ist bei vorgegebenem Sauerstoff-Druck in erster Näherung vom Draht-Querschnitt unabhängig. Die Verbrennungs-Reaktion verläuft wahrscheinlich zwischen Gasphase und Schmelze.

#### I. Allgemeines

Der anwachsende Verbrauch von flüssigem und komprimiertem Sauerstoff in Wissenschaft und Technik bringt erhöhte Gefahren mit sich. Unfälle, zum Teil mit tödlichem Ausgang, sind in den letzten Jahren immer wieder aufgetreten. Zerstörungen an Sauerstoff-Hochdruckleitungen und Armaturen werden nicht durch Explosionen im eigentlichen Sinne hervorgerufen, sondern sind meistens die Folge heftiger Verbrennungen des metallischen Werkstoffes im komprimierten Sauerstoff.

Für Zündungen innerhalb einer Sauerstoff-Hochdruckleitung oder eines Hochdruckventils kennt man mehrere Ursachen, z. B. Zündungen der Schmiermittel oder des Dichtungsmaterials durch Kompressionsstöße innerhalb der Gassäule, Reibungswärme durch transportierte oder schwingende Fremdkörper (Rost-Teilchen, Sand u. a.) sowie elektrostatische Aufladungen. Unbekannt ist, wann ein einmal eingeleiteter Metallbrand von selbst erlischt und wann er nach außen durchbricht. Systematische Untersuchungen über die beim Brennen von Metallen auftretenden Gesetzmäßigkeiten fehlen.

Zum Unterschied von den üblichen Brennstoffen bilden die Metalle mit Sauerstoff ein festes Reaktionsprodukt. Setzt man eine reine Metall-Fläche bei gewöhnlicher oder höherer Temperatur dem Angriff von Sauerstoff oder einem Sauerstoff abgebenden Gas aus, so entsteht an der Berührungsfläche eine feste Oxydschicht, die die beiden Reaktionspartner trennt. Zur Fortsetzung der Reaktion muß entweder der Sauerstoff durch die feste Oxydschicht zum Metall oder umgekehrt das Metall durch das Oxyd hindurch zum Sauerstoff diffundieren. Für beide Vorgänge kennt man Beispiele; in manchen Fällen verlaufen sie gleichzeitig und nebeneinander.

G. Tammann<sup>1)</sup> hat als erster beobachtet, daß die Reaktion sehr heftig einsetzt und dann allmählich langsamer wird, ohne vollständig zum Stillstand zu kommen. Bezeichnet man die Dicke der Oxydschicht mit  $\Delta^2$  und die Zeit mit  $t$ , so gilt für ebene Metallflächen die Beziehung

$$(\Delta^2)^2 = 2 k't$$

Dieses sog. „parabolische Anlaufgesetz“ gilt für höhere Temperaturen und hat sich bei vielen Reaktionen zwischen Metallen und Sauerstoff nachweisen lassen. Daneben beobachtet man für niedere und mittlere Temperaturen ein

<sup>1)</sup> Z. anorg. allg. Chem. 111, 78 [1920].

kubisches, ein logarithmisches und reziprok-logarithmisches, unter gewissen Umständen sogar ein lineares Zeitgesetz der Form  $\Delta\xi = k \cdot t$ .

In den dreißiger Jahren gab C. Wagner<sup>2)</sup> eine plausible Erklärung vieler solcher Anlauf-Erscheinungen. Danach erfolgt der Transport des Metalls durch die Oxydschicht nicht in Form von neutralen Metall-Atomen, sondern dissoziiert in Elektronen und Metall-Ionen. Die von Wagner aufgestellten Gleichungen haben sich gut bewährt und sind der Ausgangspunkt für eine große Zahl von Untersuchungen technisch und wissenschaftlich interessierender Probleme geworden. Eine zusammenfassende Darstellung unseres heutigen Wissensstandes findet man bei K. Hauffe<sup>3)</sup>.

Diese Anlauf- oder Zunder-Vorgänge sind durch das Vorhandensein einer festen Oxydschicht charakterisiert. Erst wenn die Reaktionswärme so hoch steigt, daß diese Oxydschicht zum Schmelzen kommt, kann eine richtige Verbrennung auftreten. Als Verbrennung oder als Brennen bezeichnet man im allgemeinen eine heftige Reaktion, die mit einer Feuer-Erscheinung verbunden ist. Der Anlaufvorgang oder die Verzunderung und der eigentliche Metallbrand unterscheiden sich aber nicht nur äußerlich (Flammen-Erscheinung, sehr unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit), sondern auch hinsichtlich der beteiligten Phasen. Die Verzunderung ist auf eine oder mehrere feste Phasen (festes Metall und u. U. mehrere feste Oxyde) und gasförmigen Sauerstoff beschränkt. Unsere Versuche haben gezeigt, daß beim Brennen, neben der immer vorhandenen gasförmigen Phase des Sauerstoffes, bei einzelnen Metallen flüssige Oxyde (Schlacken) an der Verbrennung beteiligt sind und diese unterhalten oder auch unterbinden; bei anderen ist offenbar ein vorheriges Verdampfen des zu verbrennenden Metalls erforderlich, so daß der eigentliche Verbrennungsvorgang in homogener gasförmiger Phase erfolgt.

Die Verzunderung ist mithin eine heterogene Reaktion zwischen fester und gasförmiger Phase, die Metall-Verbrennung kann heterogen zwischen flüssiger und gasförmiger Phase oder aber, bei manchen Metallen, in homogener gasförmiger Phase verlaufen.

<sup>2)</sup> Z. physik. Chem. Abt. B 27, 25 [1933]; ebenda 32, 47 [1936]; s. auch G. Masing: Handbuch der Metallphysik, Leipzig 1940, Bd. 1, Teil 2, S. 132.

<sup>3)</sup> K. Hauffe: Oxydation von Metallen und Metall-Legierungen, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heldelberg 1956.